

# **p53遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを用いた肺癌の遺伝子治療**

## **Adenoviral p53 Gene Therapy for Lung Cancer**

藤原 俊義<sup>a,b\*</sup>, 田中 紀章<sup>b</sup>

<sup>a</sup>岡山大学医学部・歯学部附属病院 遺伝子・細胞治療センター,

<sup>b</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・腫瘍外科学

キーワード: p53遺伝子 (p53), アデノウイルスベクター (Adenovirus vector), 肺癌 (Lung cancer), 臨床試験 (Clinical trial)

### **Abstract**

To determine the feasibility, safety, humoral immune response, and biological activity of multiple intratumoral injections of Ad5CMV-p53, and to characterize the pharmacokinetics of Ad5CMV-p53 in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Fifteen patients with histologically confirmed NSCLC and p53 mutations were enrolled into this phase I trial. Nine patients received escalating dose levels of Ad5CMV-p53 ( $1 \times 10^9$  to  $1 \times 10^{11}$  plaque-forming units[PFU]) as monotherapy once every 4 weeks. Six patients were treated on a 28-day schedule with Ad5CMV-p53 in combination with intravenous administration of cisplatin ( $80\text{mg}/\text{m}^2$ ). Patients were monitored for toxicity, vector distribution, antibody formation, and tumor response. Fifteen patients received a total of 63 intratumoral injections of Ad5CMV-p53 without dose-limiting toxicity. The most common treatment-related toxicity was a transient fever. Specific p53 transgene expression was detected using reverse-

transcriptase polymerase chain reaction in biopsied tumor tissues throughout the period of treatment despite of the presence of neutralizing anti-adenovirus antibody. Distribution studies revealed that the vector was detected in the gargle and plasma, but rarely in the urine. Thirteen of 15 patients were assessable for efficacy; one patient had a partial response (squamous cell carcinoma at the carina), 10 patients had stable disease, with three lasting  $\geq 9$  months, and 2 patients had progressive disease. Multiple courses of intratumoral Ad5CMV-p53 injection alone or in combination with intravenous administration of cisplatin were feasible and well tolerated in advanced NSCLC patients, and appeared to provide clinical benefit.

### **はじめに**

肺癌は、世界中で男性、女性ともに癌による死亡原因の上位にランクされている。本邦でも、肺癌による死亡者数は年間5万人を越えており、その罹患率、死亡率は急速な増加傾向にある。1993年には肺癌死亡数は胃癌死亡数を抜いて男性癌死亡原因の第1位を占めるに至っており、2001年の統計では男性39,880人、女性15,122人が肺癌によって亡くなっている<sup>1)</sup>。今後も喫煙を含めた生活習慣や社会環境を背景に増加傾向に

平成19年9月受理

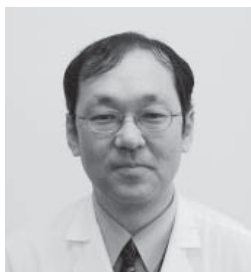
\*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

岡山大学医学部・歯学部附属病院 遺伝子・細胞治療センター

電話: 086-235-7997 FAX: 086-235-7884

E-mail: toshi\_f@md.okayama-u.ac.jp

### **プロフィール**



藤原 俊義

昭和60年岡山大学医学部医学科卒業、平成2年岡山大学大学院医学研究科（第一外科学講座）修了、医学博士取得。平成3年米国テキサス大学 MD アンダーソン癌センターに留学、胸部外科 Jack A. Roth 博士の研究室でアデノウイルスベクターによる p53遺伝子導入の癌治療への応用について研究し、現在米国で進行中の臨床試験の理論的基盤の確立に貢献した。さらに、平成6年に帰国後は、岡山大学医学部附属病院において腫瘍外科医として癌診療に関わるとともに、本邦における p53を用いた肺癌遺伝子治療の第1相臨床試験を中心となって推進してきた。平成15年岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子・細胞治療センター准教授となり現在に至る。最近、新しいウイルス製剤 Telomelysin の開発を進め、前臨床研究の後に岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマを設立、平成18年より米国で Telomelysin の臨床試験を開始した。

あると予測されており、新しい治療戦略が積極的に研究されている。その難治性の要因として、肺癌細胞が胸膜播種や遠隔臓器転移を来しやすいという生物学的特徴と、その有効な治療法が確立されていないという現状が考えられる。しかし、局所病巣に対する放射線治療は生命予後の改善に貢献しているという報告もあり<sup>2)</sup>、局所制御と転移制御の両側面から肺癌に対する治療戦略を考慮していく必要がある。

ここ20年来の分子レベルでの基礎研究により、前癌病変から早期癌、進行癌へと至る過程で癌遺伝子と癌抑制遺伝子の二つの遺伝子群の異常の段階的な関与が明らかになってきた<sup>3)</sup>。癌細胞の悪性形質である分化増殖の異常や不死化に伴うアポトーシス抵抗性の獲得などが、これらの遺伝子変異による正常機能の喪失に直接起因していることが証明されてきている。悪性化のプロセスに重要な遺伝子を標的とした「遺伝子治療」は、実験的には抗腫瘍効果が認められ、既存の化学療法や放射線療法とは異なるコンセプトに基づいた治療戦略として臨床的にも有用性が期待できる。実際に、発癌過程で異常を来した遺伝子の正常分子を補ったり、特殊な機能遺伝子を外来性に導入することで、直接的あるいは間接的に抗腫瘍効果が観察される。しかし、現実にはまだ開発の途についたばかりであり、トランスレーショナルスタディとしての臨床展開と基礎研究へのフィードバックが重要と考えられる。本稿では、癌抑制遺伝子である *p53* を用いた遺伝子治療臨床研究の進行状況を概説する。

## 治療遺伝子としての *p53*

ヒト第17番染色体短腕上に存在する癌抑制遺伝子である *p53* 遺伝子は、約50%のヒト悪性腫瘍でその機能喪失が認められ、生体ストレスに対するゲノムの安定性の維持に重要な役割を果たしている。*p53* は1979年にSV40腫瘍ウイルスの large T 抗原と結合する分子量53kDa のタンパク質として同定されたが、1989年に癌抑制遺伝子としての機能が明らかになり<sup>4)</sup>、その後の研究で特定の塩基配列に結合する転写因子として多くの遺伝子群の発現を調節することで多様な生理機能を発揮していることがわかってきた<sup>5)</sup>。すなわち、G1期、G2期チェックポイントとしての細胞周期制御、細胞の自殺経路であるアポトーシスの誘導、ゲノムの安定性を維持するためのDNA修復、あるいは血管新生抑制などである。正常なヒト *p53* 遺伝子を導入する

ことで、感受性の差はあるものの、多くの癌細胞でアポトーシス細胞死を惹起することができる<sup>6)</sup>。一方、正常なヒト気管支上皮細胞に外来性に *p53* を過剰発現させても、アポトーシスや細胞増殖抑制は観察されず<sup>7)</sup>、この選択性は、*in vivo* 遺伝子治療を行う際の安全性を確保する上での重要な根拠となりうる。

## *p53* を用いた肺癌の遺伝子治療

正常なヒト *p53* 遺伝子を発現するアデノウイルスベクター (Ad5CMV-*p53*, Advexin) は、ウイルス増殖に必要な *E1* 遺伝子領域を除去し、その部分にサイトメガロウイルス・プロモーターとヒト由来の正常な *p53* cDNA を組み込んであるため<sup>6,7)</sup> (図1)、*E1* 遺伝子でトランスフォームした293細胞内でしか増殖不可能である。すなわち、標的である癌細胞内で、投与されたウイルス濃度に応じた *p53* 遺伝子発現を誘導するが、理論的にはウイルス増殖がみられることはない。Ad5CMV-*p53* の感染により、非小細胞肺癌細胞H1299においては単独で<sup>6)</sup>、またH358においては抗癌剤シスプラチン (CDDP) との併用下で高率にアポトーシスが誘導される<sup>8)</sup>。さらに、*p53* は血管新生関連分子の発現を制御し、血管新生に抑制的に作用したり<sup>9)</sup>、CD95リガンドの発現増強を介して好中球の腫瘍局所への遊走を惹起し<sup>10)</sup>、これらの現象により *p53* 遺伝子導入されなかった周辺の癌細胞にも影響を与えることが期待される。この“バイスタンダー効果”は、抗癌剤や放射線治療では認められない機能であり、Ad5CMV-*p53* 製剤の特性の一つとして特記すべき点である。

## *p53* 遺伝子治療の多施設協同第 I 相臨床試験

岡山大学医学部附属病院を中心に、1999年3月から2003年4月まで、非小細胞肺癌に対する Ad5CMV-*p53* による第 I 相臨床試験が行われた<sup>11)</sup>。本臨床試験は、多施設共同研究として当施設で9例、東京医科大学で3例、東北大学加齢医学研究所で2例、東京慈恵会医科大学で1例、計15例の患者に63回の Ad5CMV-*p53* 投与が行なわれている (表1)。

### 1. 安全性

有害事象としては発熱が14例 (93.3%) でみられたが、Grade 3 を越えるものはなく、ほとんどが48時間以内に回復した。血液毒性では、1例 (6.7%) の Grade 1 の白血球減少と3例 (20%) の Grade 2/3 の貧血のみであった。その他、高い確率をもって発症する重

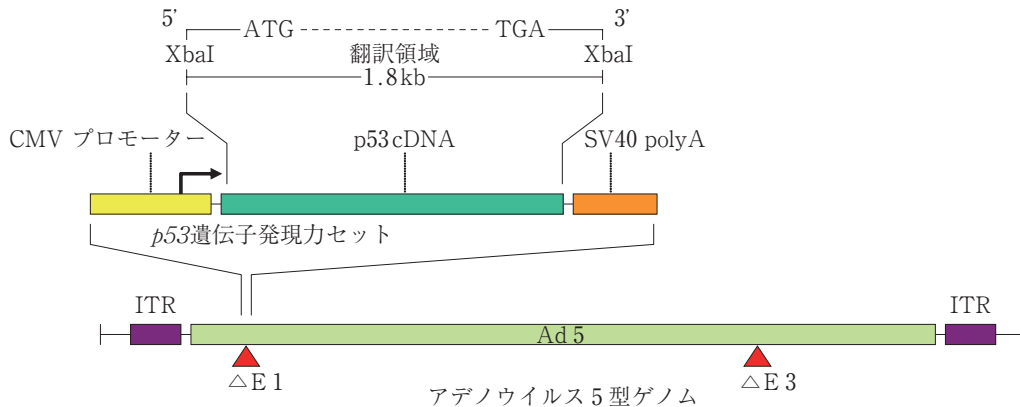


図1 Ad5CMV-p53 (Advexin) の構造

第一世代のアデノウイルスベクターでは、ウイルスの増殖に必要なE1とE3領域が除去されており、相同組み換えによりE1領域に治療遺伝子を含む発現カセットが挿入される。本ベクターでは、サイトメガロウイルス (CMV)・プロモーター、ヒト正常型 *p53* cDNA, SV40 polyadenylation signal より成る *p53* 遺伝子発現カセットが、アデノウイルス5型由来のベクターの欠損したE1部分に組み込んである。このベクターを、E1遺伝子を導入した293細胞に感染させることで、大量の治療用ベクターを産生、精製することができる。

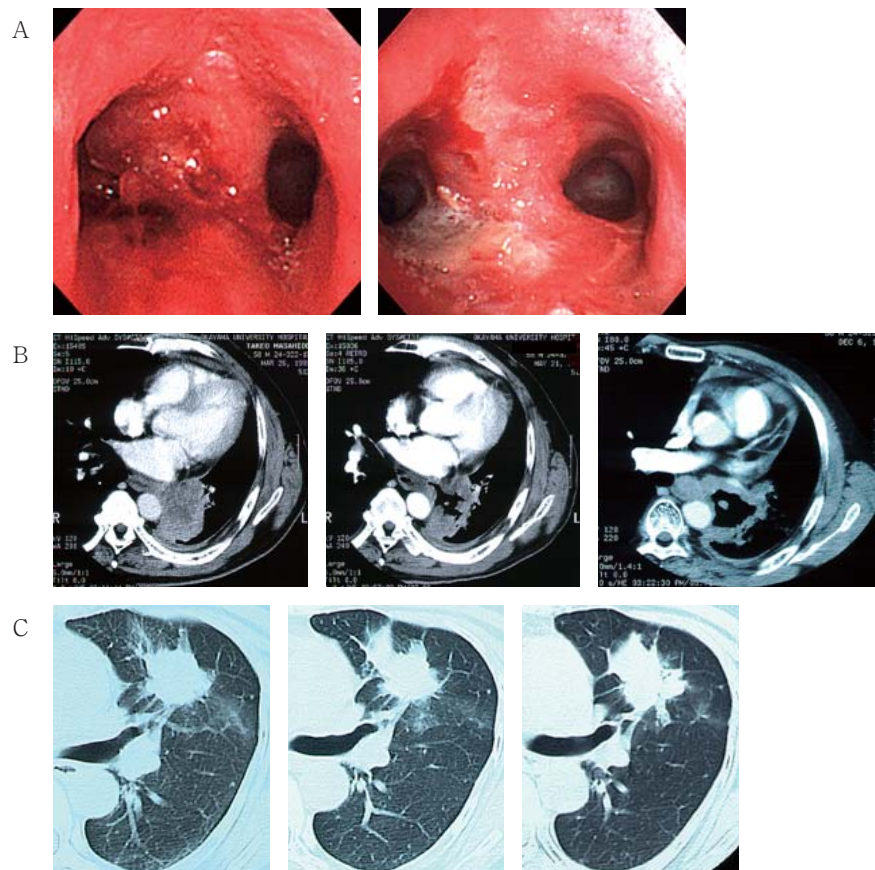


図3 本邦における *p53* 遺伝子治療の臨床効果

(A) 症例#01. 58歳男性。気管分岐部から左主気管支にかけて増殖する易出血性の扁平上皮癌に、気管支鏡下に Ad5CMV-p53の腫瘍内投与を14回施行した。(左) 治療前、(右) 4回治療後、5ヶ月目の気管支鏡所見。腫瘍は崩れ、気管分岐部は平坦になっている。出血もほとんど止まっている。(B) 症例#02. 58歳男性。治療前には左肺下葉に切除不能な扁平上皮癌を認める(左)。2ヶ月後(2回治療後)(中)、9ヶ月後(9回治療後)のCT画像では、腫瘍中心の組織破壊が認められる。(C) 症例#04. 46歳女性。左肺上葉の腺癌と両側肺野に多発性肺内転移を認める。Ad5CMV-p53の腫瘍内投与と CDDP の全身投与を受け、長期 SD が観察された。(左) 治療前、(中) 4回治療後、(右) 10回治療後。



篤な副作用は認められておらず，CT ガイド下投与の際の気胸や CDDP 由来と思われる嘔気，食欲不振はみられているが，いずれも米国の臨床試験の結果から予測される範囲内であり，日本人においても本治療は安全に施行可能であると考えられる。

## 2. 生体内分布

喀痰から抽出した DNA をテンプレートとしてベクター特異的なプライマーを用いて行った PCR 解析では， $10^9$ PFU の気管支鏡下の投与の場合，投与翌日の喀痰に最も高濃度のベクター断片が検出され，以後漸

表1 本邦における *p53*遺伝子治療臨床試験の症例

症 例	年/性	病 理	部 位	TNM 分類/病期	前治療	投与経路	投与量	回数
(岡山大学) 01	58/男	扁平上皮癌	気管分岐部	cT4N0M0 St III B	化学療法 放射線療法	気管支鏡	$10^9$ PFU	14
(岡山大学) 02	58/男	扁平上皮癌	左肺下葉	cT4N2M0 St III B	化学療法 放射線療法	気管支鏡 CT	$10^9$ PFU	9
(岡山大学) 03	66/男	扁平上皮癌	右主気管支	cT2N0M0 St I B (術前)	手術 化学療法 レーザー療法	気管支鏡	$10^9$ PFU	4
(岡山大学) 04	46/女	腺癌	左肺上葉	cT2N3M1 St IV	化学療法	CT	$10^9$ PFU+CDDP	10
(岡山大学) 05	55/男	扁平上皮癌	右肺下葉	cT4N1M0 St III B	化学療法 放射線療法	気管支鏡 CT	$10^9$ PFU+CDDP	3
(岡山大学) 06	54/男	扁平上皮癌	左肺上葉	cT3N2M0 St III B	化学療法 放射線療法	CT	$10^9$ PFU+CDDP	2
(東北大学) 07	71/男	扁平上皮癌	右肺上葉	cT4N1M0 St III B	化学療法 放射線療法	気管支鏡	$10^{10}$ PFU	2
(岡山大学) 08	52/男	扁平上皮癌	右肺下葉	cT2N2M0 St II B	化学療法 放射線療法	気管支鏡	$10^{10}$ PFU	1
(岡山大学) 09	66/男	扁平上皮癌	左肺上葉	cT2N0M0 St I B (術前)	手術 化学療法 放射線療法	CT	$10^{10}$ PFU	4
(慈恵医大) 10	51/男	腺癌	右肺下葉	cT2N2M1 St IV	化学療法	CT	$10^{10}$ PFU+CDDP	1
(東京医大) 11	51/男	腺癌	右肺上葉	cT4N3M0 St III B	化学療法	CT	$10^{10}$ PFU+CDDP	2
(東京医大) 12	61/男	扁平上皮癌	右肺上葉	cT4N2M0 St III B	化学療法 放射線療法	気管支鏡	$10^{10}$ PFU+CDDP	2
(岡山大学) 13	62/男	扁平上皮癌	左肺下葉	cT4N3M0 St III B	化学療法 放射線療法	気管支鏡	$10^{11}$ PFU	1
(東北大学) 14	70/男	扁平上皮癌	左肺上葉	cT2N2M0 St III A	化学療法 放射線療法	気管支鏡	$10^{11}$ PFU	4
(東京医大) 15	62/男	扁平上皮癌	右肺上葉	cT4N2M0 St III B	化学療法 放射線療法	気管支鏡	$10^{11}$ PFU	4

減し、平均して 7 日目の喀痰では検出されなくなっていた。CT ガイド下投与では気管支鏡下投与の際ほど検出はされないが、サイクルによっては投与翌日に強いバンドが認められた。また、腫瘍内局所投与にもかかわらず、投与後 30 分をピークに血漿中にベクターが検出された。しかし、ベクター断片の全身循環に由来すると思われる有害事象は認められていない。一方、尿中にはほとんどベクターは検出されておらず、2 症例で一時的に認められたのみであった。Ad5CMV-*p53* 投与前後の生検サンプルの解析では、48 時間後に採取した組織の DNA-PCR により 42 回の投与のうち 37 回でベクターが確認されており、ほとんどのケースで確実にベクターが標的部位に deliver されていることが証明された。2 症例では、それぞれ最終投与後 25 日目、151 日目に剖検が可能であった。いずれも腫瘍組織からは DNA-PCR にてベクター断片が検出され、近位リンパ節でも確認された。また、同サンプルの RT-PCR により 42 回中 34 回で *p53* mRNA 発現が認められ、高率に *p53* 遺伝子発現が誘導されていることが明らかになった。さらに、血中抗アデノウイルス中和抗体価は、ほぼ全例で初回投与後に上昇していた。すなわち、抗体価の上昇にもかかわらず *p53* 遺伝子発現は持続的に保たれており、局所投与の場合には全身循環する血中中和抗体は導入遺伝子発現に顕著な影響をおよぼさないと推測された。また、血中抗 *p53* 抗体価は 3 例で比較的継続的に上昇がみられたが、2 例は治療前から上昇しており、その他の症例では有意な変化は認められなかった。

### 3. 臨床効果

臨床効果は 15 例中 13 例 (86.7%) で評価可能であったが、PR 1 例 (7.7%)、SD 10 例 (76.9%)、PD 2 例 (15.4%) であり、3 例の SD 症例では 9 ヶ月以上にわたる病状の安定がみられた。さらに、1 例の PR 症例と 2 例の SD 症例、計 3 例は 6 回以上の治療を受けており、呼吸機能の改善、血痰の消失、肺活量の増加と咳症状の軽快などの QOL (quality of life) の改善や腫瘍マーカーの低下などの臨床的有用性が確認された。生存率は 1 年 40%、2 年 13%、3 年 7% であった (図 2)。

第 1 例目の症例では、気管分岐部の扁平上皮癌の退縮 (PR) が見られ、1 年間、計 14 回の投与を行うことが可能であった。治療期間中、病理学的には CR には至らなかったが、腫瘍量は明らかに減少し、そこから

の腫瘍増殖は月 1 回のベクター投与で抑制されていた (図 3)。左肺上葉の腺癌を持つ第 4 例目の症例でも、前医で大量の抗癌剤を使用したにもかかわらず増大していた腫瘍が、遺伝子治療と CDDP の併用を開始するとその増殖が止まり、治療を中止した約 10 ヶ月後までほぼサイズが変化しなかった (図 3)。さらに興味深い点は、この症例では両肺野に多数みられた微小肺内転移も治療期間中増大しなかったことである。東京医大で治療された右肺上葉の腺癌を持つ第 10 例目では、CDDP を併用する遺伝子治療を 2 回施行した後、放射線療法を行った。その後、3 年以上にわたり腫瘍サイズはほとんど変化せず、治療開始から 3 年 9 ヶ月の生存が得られた。本症例では、*p53* 遺伝子導入により放射線感受性が誘導された可能性が示唆される。これらの症例では、明らかに腫瘍の増殖抑制が観察されており、最終的には再増殖に至ったとしても、その有効性は評価可能と考えられる。

### 肺癌に対する遺伝子治療の今後の方向性

腫瘍内投与を行う現行の方法では、例え局所的には臨床的効果が認められても限界があり、進行肺癌症例において *p53* 遺伝子治療による治癒は期待できない。左肺下葉原発の扁平上皮癌を呈した第 2 例目では、気管支鏡下の Ad5CMV-*p53* 投与により左下葉支の部分的開通と腫瘍中心部の破壊像が認められ、左下肺の無気肺に一部含気が戻り、呼吸機能の改善、具体的には肺活量の増加と咳症状の軽快が観察された (図 3)。計 9 回の投与を行い、良好な時期は比較的長期間継続したが、肋骨転移が出現したため臨床試験は中止となった。最後の CT でも原発巣内部が崩壊し、局所効果

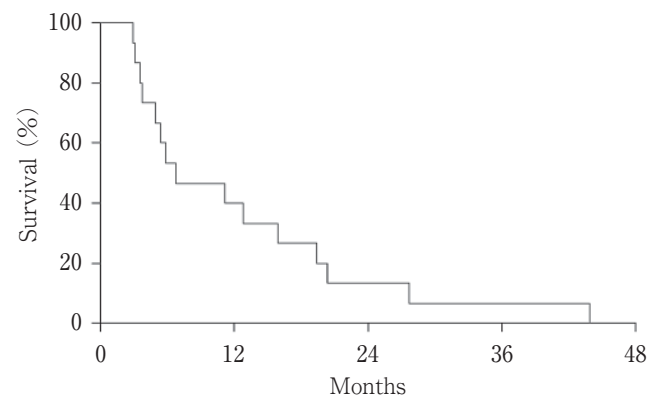


図 2 *p53* 遺伝子治療による生存曲線  
治療を受けた 15 例の Kaplan-Meier 解析による生存曲線

は持続していたと考えられるが、最終的には治療開始から約11ヶ月後に亡くなられた。また第6例目では、左肺尖部の扁平上皮癌は治療期間中増大はみられなかったが、CDDPを併用していたにもかかわらず右上腕の筋肉内に転移が出現し、約6ヶ月後に死亡された。いずれの症例でも局所制御に関しては有用であったが、全身病である肺癌に対する予後の改善には残念ながら貢献しているとは言い難い。

今後の方向性として、より早期の無治療症例における集学的治療の一つとしての応用が考えられる。また、外科治療との併用において腫瘍縮小により切除率を上げたり、術中の癌細胞の散布を予防することが期待される。さらに気管支閉塞症例において、ステント挿入後に腫瘍内投与を行うことでその再増殖を阻止することが可能となるかもしれない。適応症例や投与方法を検討することで、より臨床応用に即した、簡便に施行可能な治療法としての有用性を検討していく必要がある。

## おわりに

p53は多彩な生理機能によりゲノムの安定性を保っており、遺伝子治療の治療遺伝子として極めて魅力的な分子である。p53が正常細胞にほとんど影響を与えず、癌細胞を選択的にアポトーシスに誘導する機能は重要であり、また血管新生抑制や分化/老化誘導などの複数の作用機構が期待できる点は大きな利点と思われる。簡便に投与でき、しかも重篤な副作用がなく、抗腫瘍効果が得られれば、たとえ治癒に至らなくとも十分に臨床的には有用である。米国食品医薬品庁 (Food and Drug Administration : FDA) は2003年9月、アデノウイルス製剤 Ad5CMV-p53 (Advexin) を、第Ⅲ相臨床試験が進んでいる頭頸部腫瘍に対して Fast Track Product として認定した。Advexin はバイオベンチャー Introgen Therapeutics 社の開発製品であるが、これによりオーファンドラッグとしての承認が加速され、初めての遺伝子治療製剤として日常臨床で使われるようになると考えられる。今後さらに基礎研

究、臨床研究が進むことで p53遺伝子治療の安全性や有効性が確認され、非小細胞肺癌をはじめとする肺癌治療に広く使用されるようになることを期待する。

## 文 献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部「人口動態統計」。
- 2) Saunders M, Dische S, Barrett A, et al. : Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small-cell lung cancer : a randomised multicentre trial. CHART Steering Committee. Lancet (1997) **350**, 161-165.
- 3) Fearon ER, Vogelstein B : A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell (1990) **61**, 759-767.
- 4) Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ : The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell (1989) **57**, 1083-1093.
- 5) Levine AJ : p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell (1997) **88**, 323-331.
- 6) Ohtani S, Kagawa S, Tokunaga N, et al. : Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 *in vivo*. Mol Cancer Ther (2004) **3**, 93-100.
- 7) Zhang WW, Alemany R, Wang J, et al. : Safety evaluation of Ad5CMV-p53 *in vitro* and *in vivo*. Hum Gene Ther (1995) **6**, 155-164.
- 8) Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, et al. : Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells *in vivo* by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. Cancer Res (1994) **54**, 2287-2291.
- 9) Nishizaki M, Fujiwara T, Tanida T, et al. : Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic : a proposed mechanism for bystander effect. Clin Cancer Res (1999) **5**, 1015-1023.
- 10) Waku T, Fujiwara T, Shao J, et al. : Contribution of CD95 ligand-induced neutrophil infiltration to the bystander effect in p53 gene therapy for human cancer. J Immunol (2000) **165**, 5884-5890.
- 11) Fujiwara T, Tanaka N, Kanazawa S, et al. : Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 (ADVEXIN) in patients with advanced non-small cell lung cancer. J Clin Oncol (2006) **24**, 1689-1699.